

MONOCLONAL ANTIBODY-CONTAINING LYOPHILIZED PREPARATION**Publication number:** JP5065233**Publication date:** 1993-03-19**Inventor:** FUKUDA TAMOTSU; SHIMAZAKI YUKIO; KUROIWA YASUYUKI; TAKAGI SHIRO**Applicant:** MITSUI TOATSU CHEMICALS**Classification:****- international:** C07K16/00; C07K16/12; A61K38/00; C07K16/00; C07K16/12; A61K38/00; (IPC1-7): A61K9/14; A61K39/395; A61K47/12; A61K47/42**- european:** C07K16/00; C07K16/12A14**Application number:** JP19920041015 19920227**Priority number(s):** JP19910043431 19910308**Also published as:**

EP0531539 (A1)
 WO9215331 (A)
 FI924982 (A)
 EP0531539 (A4)
 EP0531539 (B1)

[Report a data error](#)**Abstract of JP5065233**

PURPOSE: To provide a stable monoclonal antibody-containing lyophilized preparation prevented in the denaturation of the monoclonal antibody on its lyophilization treatment and in the lowering of its antigen-bonding activity. **CONSTITUTION:** A monoclonal antibody solution containing a monoclonal antibody and gelatin or the monoclonal antibody and a carboxylic acid or its salt is lyophilized to provide the objective lyophilized preparation. The lyophilized product was dissolved in distilled water, and its antigen-bonding activity was measured. Consequently, it was found that the lyophilized monoclonal antibody sufficiently maintained the antigen-bonding activity of the non-lyophilized monoclonal antibody.

~~Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide~~

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

特開平5-65233

(43)公開日 平成5年(1993)3月19日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 39/395	M	8413-4C		
9/14	D	7329-4C		
47/12	J	7329-4C		
47/42	J	7329-4C		

審査請求 未請求 請求項の数10(全 8 頁)

(21)出願番号 **特願平4-41015**

(22)出願日 平成4年(1992)2月27日

(31)優先権主張番号 **特願平3-43431**

(32)優先日 平3(1991)3月8日

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000003126

三井東圧化学株式会社

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(72)発明者 福田 保

千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学
株式会社内

(72)発明者 島崎 幸雄

千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学
株式会社内

(72)発明者 黒岩 保幸

千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学
株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体含有凍結乾燥製剤

(57)【要約】

【目的】 モノクローナル抗体の凍結乾燥処理時に生じる変性と、抗原結合活性の低下を防止した、安定なモノクローナル抗体含有凍結乾燥製剤を提供する。

【構成】 モノクローナル抗体とゼラチン、或はモノクローナル抗体とカルボン酸もしくはその塩を含有するモノクローナル抗体溶液を凍結乾燥する。乾燥後該乾燥物に蒸留水を加えてを溶解し、抗原結合活性を測定した。その結果モノクローナル抗体は凍結前の抗原結合活性をよく保持した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 モノクローナル抗体及びゼラチンを含有することを特徴とする凍結乾燥製剤。

【請求項2】 モノクローナル抗体及びカルボン酸もしくはその塩を含有するpH 6.1～8.1である溶液を凍結乾燥して調製した製剤。

【請求項3】 カルボン酸がクエン酸である請求項2記載の製剤。

【請求項4】 凍結乾燥前の溶液のpHが、4.0～8.1である請求項1記載の製剤。

【請求項5】 モノクローナル抗体がヒト由来である請求項1～4記載のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項6】 モノクローナル抗体のグロブリンタイプがIgM型である請求項1～4記載のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項7】 ゼラチンが中性ゼラチンあるいは酸性ゼラチンである請求項1あるいは請求項4記載の製剤。

【請求項8】 製剤が、さらにカルボン酸あるいはその塩もしくは無機塩を含有する請求項1あるいは請求項4記載の製剤。

【請求項9】 製剤が、さらに単糖類、二糖類、糖アルコールまたはアミノ酸のうち少なくとも1種を含有する請求項1～4記載のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項10】 製剤が、複数のモノクローナル抗体を含む請求項1～4記載のいずれか1項に記載の製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、モノクローナル抗体を主成分とする凍結乾燥製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 モノクローナル抗体は、特定のエピトープのみに反応性を有する均一なグロブリンタンパク質である。近年、細胞融合、培養、及びタンパク質精製技術等の進歩により、モノクローナル抗体の大量調製が可能となり、例えば、各種分析、診断、治療、予防等、広い分野で利用されるようになった。中でも、治療あるいは予防薬として、モノクローナル抗体への期待が高まっている。とりわけヒトに対する適用は今後更に進展することが予想され、抗原性の点で好ましいヒト由来のモノクローナル抗体の開発が進められている。

【0003】 従来、当該分野においては同様な目的のために免疫グロブリンなどのポリクローナルな抗体が診断治療に使用されてきた。モノクローナル抗体が特定のエピトープのみに反応性を有する均一なものであるのに対し、ポリクローナルな抗体はその名の通り複数の抗体の混合物である。そのためポリクローナルな抗体は性質の異なる分子が相互に安定化し合い、全体として比較的安定な状態となっている。しかし、精製されたモノクローナル抗体は異なる分子同志の相互作用による安定化が期待できず、そのグロブリンタイプによらず、種々の物理

的、化学的作用に対して不安定である。

【0004】 モノクローナル抗体やポリクローナルな抗体等のグロブリン蛋白は、特に診断及び治療を目的とした場合、混入するウイルスの不活化のために加熱処理が施されることがある。また、該グロブリン蛋白は溶液状態では長期保存には向かない。そのため凍結乾燥が該グロブリン蛋白分子を安定保存するための製剤形態として汎用されている。更に、必要により該グロブリン蛋白は酸・アルカリ処理なども行われる。

10 【0005】 これらの加熱、凍結乾燥、酸・アルカリ処理に対して、ポリクローナルな抗体は一般に安定であるのに対し、モノクローナル抗体はそれらの処理等により変性し、その活性を失いやすい。とりわけ 1gM は他のグロブリンタイプのモノクローナル抗体（例えば IgG、IgA、IgE）に比べてより不安定である。加熱処理については例えば特開昭61-76423にはモノクローナル抗体が加熱処理に対して不安定であり、この熱的不安定性を克服するためにモノクローナル抗体製剤中に卵アルブミン加水分解物を添加する事を開示している。一方、凍結乾燥処理においてはモノクローナル抗体に特有な問題点がある。即ちモノクローナル抗体を凍結乾燥するに際して、モノクローナル抗体溶液を安定化剤を添加せずに凍結乾燥した場合、その処理中に生じる変性により抗原結合活性が低下するという問題が生じ、これを防止することが必要である。このような問題点はモノクローナル抗体において顕著であり、ポリクローナルな抗体の場合は上記の理由からもともと安定であり、大きな問題とはならない。モノクローナル抗体の凍結乾燥物の調製には、凍結乾燥前の溶液に異種タンパク質であるアルブミンを添加したり（例えば特開昭60-146833、特開昭61-78730、特開昭61-78731、WO 90/11091）、糖質であるマルトースを添加すること（例えばWO 89/11297）が既に公知である。

20 【0006】 ポリクローナルな抗体である免疫グロブリンは、比較的高濃度で用いられることが多く、溶液保存あるいはそれに続く凍結乾燥処理時に凝集体が生成することがある。この凝集体は該グロブリンを静注した場合に見られるアナフィラキシー様の重篤な副作用の原因と考えられている。そこで凝集体の形成を抑えるために保存溶液に異種タンパク質を加えることが知られている。例えば、異種タンパク質であるゼラチンを単独で免疫グロブリン溶液に添加したり（例えば特開昭58-167518、Vox.Sanq.(1983)51,81-86）、あるいは糖質であるショウガロースとゼラチンを併用して添加すると、保存中の凝集体形成が防止され、更に抗菌、抗ウイルス作用が保持されることが知られている（SU 700132）。これらに開示されることはポリクローナルな抗体である免疫グロブリンを高濃度溶液中とした場合の凝集体形成の防止を目的としている。そしてこれらの何れにも凍結乾燥処理による抗原結合活性の低下に関しては論じられていない

い。これに対して、モノクローナル抗体は比較的低濃度で保存ないし凍結乾燥される。そしてそのような低濃度であっても凍結乾燥処理時に生じる変性とそれに伴う抗原結合活性の低下が問題となる。そしてこの問題の解決にゼラチン添加（免疫グロブリンにおける凝集体形成の防止のためには有用であった）が有用であるか否かについては従来知られていなかった。

【0007】他方、カルボン酸及びその塩が、多くのタンパク質溶液のpH維持のための緩衝液の成分として使用されることは広く知られている。例えばWO89/11298では、モノクローナル抗体保存溶液に沈殿する凝集体形成の防止のため、安定化剤としてマルトース、食塩、リン酸ナトリウムを添加することが開示されているが、その際緩衝液成分としてリン酸ナトリウムの他にクエン酸ナトリウムも使用することが例示されている。しかし、これはモノクローナル抗体溶液の保存中に生じる凝集体形成を防止することについて示されるもので、モノクローナル抗体の凍結乾燥処理さらには該処理時のモノクローナル抗体の変性とそれに伴う抗原結合活性の低下の防止については何も開示していない。また、WO 89/11297では、凍結乾燥前のモノクローナルIgG抗体溶液にマルトースを安定化剤として添加し、更に酢酸ナトリウムを緩衝液の成分として5～10ミリモルの濃度に添加して、該溶液のpHを3～6の酸性領域に維持することが開示されている。この場合、酢酸ナトリウムの使用は明らかに緩衝液の成分としてのものであり、WO 89/11297にはカルボン酸及びその塩がpH緩衝作用を示す範囲を超えたpHにおいても凍結乾燥処理時の抗体の変性を防止するための安定化剤として作用することについては何ら示されていない。また、該抗体溶液のpHについては注射剤として低いpHの抗体溶液を静注した場合、投与部位に傷みを生ずる場合がある。該抗体溶液を注射剤として用いる場合、中性付近のpH範囲が望ましいが、このpH範囲での利用についてもWO 89/11297には示されていない。

【0008】また、免疫グロブリンを血清や血漿から調製する際に混入する恐れのあるウイルスの不活化を目的として、免疫グロブリンを溶液状態で加熱処理することがある。例えば特開昭62-292731、特開昭61-194035、特開昭61-191622あるいは特開昭57-140724では、カルボン酸を該グロブリン溶液に添加することが示されている。また、特開昭61-78730及び特開昭61-78731では、免疫グロブリンを乾燥状態で加熱処理する際に酢酸ナトリウムを添加することが示されている。しかし、これらはいずれも加熱処理の際の安定化を目的としてカルボン酸を添加しているに過ぎない。即ち凍結乾燥処理時の抗体の変性とそれに伴う抗原結合活性を防止するためにカルボン酸及びその塩が有用であるか否かについてはこれまで知られていなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、モノクローナル抗体の凍結乾燥処理時に生じる変性と、それに伴う抗原結合活性の低下を防止した、安定なモノクローナル抗体凍結乾燥製剤を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために銳意検討を行った結果、モノクローナル抗体の凍結乾燥処理においてモノクローナル抗体の安定化のためにゼラチン、カルボン酸もしくはその塩が有効であることを見いたした。すなわち、凍結乾燥前のモノクローナル抗体を含む溶液がゼラチンを含有することにより、凍結乾燥処理時に生じるモノクローナル抗体の変性と、それに伴う抗原結合活性の活性の低下を防止出来ること。また凍結乾燥前のモノクローナル抗体を含む溶液がカルボン酸もしくはその塩を含有することにより、広い範囲のpH領域で、しかも緩衝作用を示す範囲外のpHにおいても凍結乾燥処理時に生じるモノクローナル抗体の変性と、それに伴う抗原結合活性の低下を防止出来、これによりモノクローナル抗体の安定かつ安全性の高い製剤組成物の作製が可能であることを見いたし、本発明を完成するに至った。

【0011】即ち、本発明はモノクローナル抗体及びゼラチンを含有することを特徴とする凍結乾燥製剤及びモノクローナル抗体及びカルボン酸もしくはその塩を含有するpH 6.1～8.1である溶液を凍結乾燥して調製した製剤を提供するものである。

【0012】以下、本発明を具体的に説明する。本発明に使用されるモノクローナル抗体としては、ヒト、マウス、ラット等から通常得られるモノクローナル抗体であり、その由来や生産手段を問わない。例えば従来報告されている細胞融合法や形質転換法等の方法により作製した抗体産生細胞や、クローンングした抗体遺伝子を組み込んだ細胞を培養して得た培養液、あるいはこのような抗体産生細胞を移植したマウスの腹水等から、本発明に使用されるモノクローナル抗体を得ることができる。これらの細胞培養液あるいはマウスの腹水等から得られるモノクローナル抗体の精製方法としては、硫酸アンモニウム塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルfiltration、アフィニティクロマトグラフィー、超遠心分離、吸着クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー等の方法が使用できる。本発明に使用されるモノクローナル抗体のグロブリンタイプは、IgG、IgM、IgA及びIgEであることが多いが、特にそのタイプは問わず、いずれのグロブリンタイプのものも使用できる。その中でも特にIgMは、他のグロブリンタイプの抗体に比べてより不安定なため、IgM型のモノクローナル抗体において有効な安定化の方法は、他のグロブリンタイプのモノクローナル抗体にも容易に適用される。また、本発明において、モノクローナル抗体は単独で用いてもよいし、複数のモノクローナル抗体を混合して用いても差し

支えない。

【0013】ゼラチンは、その調製方法により等電点の異なる二つのタイプ（中性タイプと酸性タイプ）が得られるが、本発明に用いるのはそのいずれでも良く、更にオキシボリゼラチン、変性液状ゼラチン等の化学的修飾を受けたゼラチンも使用可能である。

【0014】カルボン酸としては、クエン酸、酢酸、シユウ酸、コハク酸、フマル酸等が使用できるが、クエン酸が好ましい。また、カルボン酸の塩としては、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、シユウ酸ナトリウム、シユウ酸カリウム、コハク酸ナトリウム、コハク酸カリウム、フマル酸ナトリウム、フマル酸カリウム等が使用できるが、クエン酸ナトリウムが好ましい。

【0015】また、モノクローナル抗体の安定化、または溶液のpH調整、等張化及び緩衝作用を目的として、ゼラチン、カルボン酸あるいはその塩に加え、更に無機塩、単糖類、二糖類、糖アルコールもしくはアミノ酸を添加することも可能である。無機塩は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム等が使用できるが、塩化ナトリウムが好ましい。単糖類は、グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース等が使用できるが、グルコースあるいはマンノースが好ましい。二糖類は、マルトース、シュークロース、ラクトース等が使用できるが、マルトースあるいはシュークロースが好ましい。糖アルコールは、ソルビトール、マンニトール等が使用できるが、マンニトールが好ましい。アミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、アルギニン、リジン、ヒスチジン、プロリン、トリプトファン、メチオニン、システイン等が使用できるが、グリシンあるいはアルギニンが好ましい。

【0016】本発明の凍結乾燥製剤を作製するには、ゼラチン、カルボン酸もしくはその塩を含有するモノクローナル抗体溶液を凍結乾燥すれば良い。好ましくは、ゼラチン、カルボン酸もしくはその塩を含有し、pHの調整された緩衝液にモノクローナル抗体溶液を添加すること、あるいはモノクローナル抗体溶液にゼラチン、カルボン酸もしくはその塩を添加すること等により行うことができる。本発明で用いられるモノクローナル抗体の溶液中の濃度は、0.01mg/mlから50mg/mlであり、好ましくは、0.1mg/mlから10mg/mlである。ゼラチンの添加量は、モノクローナル抗体1重量部に対し100分の1重量部から100重量部であり、好ましくはモノクローナル抗体1重量部に対し10分の1重量部から10重量部である。添加されるカルボン酸もしくはその塩の濃度は2mMから500mMであり、好ましくは10mMから200mMである。

【0017】モノクローナル抗体を溶解する溶液のpH

は、ゼラチンを添加する場合はpH4.0～8.1であり、カルボン酸を添加する場合、及びゼラチンとカルボン酸の両方を添加する場合はpH6.1～8.1であり、好ましくはpH6.5～7.8である。pHの調整は、通常用いられる有機酸や無機酸、無機塩等の化合物を単独或は組み合わせて使用することが出来る。pH調整に使用できる化合物としては例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、リン酸、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、塩酸、トリスヒドロキシメチルアミノメタン、酢酸、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、水酸化ナトリウム、ホウ酸、ホウ酸ナトリウム、ホウ酸カリウム等が例示できる。モノクローナル抗体を溶解する緩衝液の濃度は5mMから500mMであり、好ましくは10mMから500mMである。このように、カルボン酸もしくはその塩はpH調整に際しても使用され得るが、上記の量はこれらも含む全量を意味する。

【0018】この様にして調製されたモノクローナル抗体溶液は、このまま凍結し凍結乾燥しても十分安定であるが、溶液の等張化やモノクローナル抗体の容器付着性等を防止する目的で、ツイーン20やツイーン80等の界面活性剤、ヒトや牛等のアルブミン、あるいはEDTA等のキレート剤等を添加することも可能である。モノクローナル抗体溶液の凍結乾燥は、通常知られる方法で行うことができ、その乾燥温度、真空度は適宜選択できる。

【0019】

【実施例】以下、実施例を示して本発明を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。また、本発明ではモノクローナル抗体として1gMを例示しているが、1gMは上述したごとく他のグロブリンタイプの抗体（例えば1gG、1gA及び1gE）に比べて不安定であり、1gMで示される安定化効果は、他のグロブリンタイプの抗体に容易に適用できるものである。

【0020】本願における抗緑膿菌抗体の抗原結合活性の測定法は以下の通りである。

（抗原結合活性測定法）E血清型緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27581）ホルマリン死菌体より田辺ら（免疫実験操作法C、(1978)1793-1801）の方法により調製したリボ多糖（LPS）をリン酸緩衝化生理食塩液（以下PBSと称する）に1mg/ml濃度となる様に溶解し、これを0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）で500倍に希釈した後、96穴EIAプレート（グライナー社、イミュロン-600）の各ウエルに50μlずつ分注した。4°Cに一晩放置して固定化した後、0.05%Tween20を含むPBS（以下洗浄液と略す）で洗浄し、0.5%牛血清アルブミンを含むPBS（以下ブロック液と略す）を各ウエル当たり200μlずつ分注し、室温で1時間振とうして非特異的タンパク質結合部位を飽和させた。ブロック液を除去した後、適当な濃度から順次倍々希釈した被検体溶液をウエル当たり100

μ l ずつ入れ、室温で2時間振とうした。洗浄液で4回洗浄した後、ブロック液で1000倍に希釈したバーオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト1gM抗体（タゴ社）をウェル当り100 μ l ずつ分注し、室温で2時間振とうした。洗浄液で4回洗浄した後、0.1Mクエン酸緩衝液（pH 4.0）で1回洗浄し、1mg/ml 12, 2'-アジノビス（3-エチルベンズチアゾリン-6-スルフォニックアシド）及び0.003%過酸化水素水を同緩衝液に含む基質溶液をウェル当り50 μ l ずつ分注し、室温で振とうした。30分後、2%コハク酸をウェル当り50 μ l ずつ加えて酵素反応を停止させた後、414nmにおける吸光度を96穴プレートリーダー（日本インターメッド社）にて測定した。希釈倍率の逆数と吸光度の間で両対数プロットを行い、吸光度0.1を示すときの希釈倍率を求め、これを抗原結合活性とした。

【0021】実施例1

E血清型綠膿菌に反応性を有するエプスタイン・バー・ウイルス（EBウイルス）形質転換細胞株MP-5038（微研条寄第1596号）を培養し、その培養上清から硫酸アンモニウム塩析、セファクリルS-3000（ファルマシア社）を用いたゲル通過、ヒドロキシアバタイトHPLCカラム（三井東圧化学）及びブルーセファロース（ファルマシア社）を用いたカラムクロマトグラフィーにより、ヒト・モノクローナル抗体を精製した。この方法で得られたモノクローナル抗体は、SDS-電気泳動及びゲル通過カラムを用いたHPLCによる分析で、9.9%以上の純度を有していた。このモノクローナル抗体を終濃度として0.1mg/mlとなる様にPBSに溶解した。一方、ゼラチン（ニッピ社、ハイグレードゼラチン、タイプA（中性ゼラチン）及びタイプB（酸性ゼラチン））を終濃度として0.001から1%となる様に加え、2ml容量のポリプロピレン製クライオチューブ（コーニング社）に0.5mlずつ無菌的に分注し、-80°Cにて凍結させた。これを真空減圧下凍結乾燥した。乾燥後、凍結前と等量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、以下の方法によりモノクローナル抗体の抗原結合活性を測*

緩衝液 (0.2M)	pH	ゼラチン濃度 (%)	抗原結合活性
クエン酸ナトリウム	4.0	0.01	10
	5.0	0.01	10
	6.0	0.01	10
リン酸ナトリウム	6.2	0.01	10
	7.0	0.01	10
	8.1	0.01	10

【0025】実施例3

クエン酸ナトリウムを含まないかあるいは2または10mM含有し、pH 7に調整された20mMリン酸緩衝液

*定した。凍結前の抗原結合活性を10とした相対活性で、結果を表1（表1）に示した。ゼラチンを添加せずにモノクローナル抗体を凍結乾燥した場合、抗原結合活性は大きく減少した。これに対して、ゼラチンを添加した場合、凍結乾燥後においても抗原結合活性が良く回収され、その効果は添加したゼラチンの濃度に依存した。

【0022】

【表1】

ゼラチン濃度 (%)	抗原結合活性	
	中性ゼラチン	酸性ゼラチン
0	2	2
0.001	4	3
0.003	6	6
0.01	10	8
0.03	10	10
0.1	10	10
1	10	10

【0023】実施例2

実施例1に用いたモノクローナル抗体を終濃度として0.1mg/mlとなる様に各pHの緩衝液に溶解した。一方、中性ゼラチンを終濃度として0.01%となる様に加え、ポリプロピレン製クライオチューブに0.5mlずつ無菌的に分注し、-80°Cにて凍結させ、真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、抗原結合活性を測定した。凍結前の活性を10とした相対活性で、結果を表2（表2）に示した。いずれのpHにおいても抗原結合活性は良く回収された。

【0024】

【表2】

に、実施例1で用いたモノクローナル抗体を終濃度として0.1mg/mlとなる様に溶解した。この際、溶液の塩濃度を塩化ナトリウムで150mMに調整した。

9

このモノクローナル抗体溶液を、ポリプロピレン製クライオチューブに0.5mlずつ無菌的に分注し、-80°Cにて凍結し、真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、抗原結合活性を測定した。凍結前の活性を10とした相対活性で、結果を表3(表3)に示した。クエン酸ナトリウムを含有せずにモノクローナル抗体を凍結乾燥した場合、*

10

*抗原結合活性は大きく減少した。これに対して、クエン酸ナトリウムを含有した場合、凍結乾燥後においても抗原結合活性が良く回収され、その効果は含まれるクエン酸ナトリウムの濃度に依存した。

【0026】

【表3】

クエン酸ナトリウム濃度 (mM)	0	2	10
抗原結合活性	2	5	9

【0027】実施例4

クエン酸ナトリウムを10mMから200mMの濃度に含有し、pH 6.1~8.1に調整された50mMリン酸緩衝液に、実施例1で用いたモノクローナル抗体を、終濃度として0.1mg/mlとなるように溶解した。この際、溶液の塩濃度が150mMに満たない場合、塩化ナトリウムを添加して150mMとした。このモノクローナル抗体溶液を、ポリプロピレン製クライオチューブに0.5mlずつ無菌的に分注し、-80°Cにて凍結し、真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、抗原結合活性を測定した。凍結前の活性を10とした相対活性で、結果を表4(表4)に示した。pH 6.1~8.1でクエン酸ナトリウムを含有することにより、凍結乾燥後も抗原結合活性が良く回収された。

【0028】

【表4】

溶液のpH	抗原結合活性			
	クエン酸ナトリウム濃度 (mM)			
	10	50	100	200
6.1	10	10	10	10
7.0	9	10	10	10
8.1	9	10	10	-

【0029】実施例5

30

※40

ゼラチン濃度 (%)	低分子物質濃度 (%)	抗原結合活性				
		グルコース	シュークロース	マンニトール	グリシン	アルギニン
0.003	0.001	7	7	7	8	7
0.003	0.003	8	8	7	8	8
0.003	0.01	8	6	8	10	8
0.003	0.03	8	8	8	10	8

11	12
0. 003	0. 1
0. 003	0

【0031】実施例6

実施例1で用いたモノクローナル抗体を終濃度として0.1mg/mlとなる様にPBSに溶解した。一方、中性ゼラチンを終濃度として0.003%となる様に加え、更にマンニトールを終濃度として0.5あるいは1%となる様に加えた。ポリプロピレン製クライオチューブに0.5mlずつ無菌的に分注し、-80°Cにて凍結させた。これを真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等容*

*量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、抗原結合活性を測定した。凍結乾燥前の活性を10とした相対活性で、結果を表6（表6）に示したが、いずれのマンニトール濃度においても抗原結合活性が良く回収された。

【0032】

【表6】

マンニトール濃度 (%)	0. 5	1. 0
抗原結合活性	10	10

【0033】実施例7

実施例1で使用したモノクローナル抗体を、1mg/mlの濃度となるように、中性ゼラチン（0.01%）、クエン酸ナトリウム（0.02M）、マンニトール（0.5%）及び塩化ナトリウム（0.05M）を含む0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解した。このモノクローナル抗体溶液を、10ml容量のガラス製バイアル（岩城ガラス社）に1mlずつ無菌的に分注し、-80°Cにて凍結し、真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等容量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、抗原結合活性を測定した。その結果、モノクローナル抗体は、凍結前の抗原結合活性を保持していた。

【0034】実施例8

実施例1で用いたモノクローナル抗体を、1mg/mlの濃度となるように、クエン酸ナトリウム（0.02M）、塩化ナトリウム（0.05M）、マンニトール（0.5%）を含む0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解した。このモノクローナル抗体溶液をガラス製バイアルに分注し、-80°Cにて凍結後、真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等容量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、実施例1に従って抗原結合活性を測定した。その結果、モノクローナル抗体は、凍結前の抗原結合活性を保持していた。

【0035】実施例9

細胞融合法により作製し、A血清型綠膿菌に対して反応性を有するヒトIgMを産生するヒト・ヒトハイブリドーマMP-5121（微工研条寄2270号）を培養し、その培養上清から実施例1に従って、モノクローナル抗体を精製した。このモノクローナル抗体を1mg/mlの濃度となるように、クエン酸ナトリウム（0.02M）、塩化ナトリウム（0.05M）、マンニトール（0.5%）を含む0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解した。このモノクローナル抗体溶液をガラス製バイアルに分注し、-80°Cにて凍結後、真空減圧下

凍結乾燥した。凍結前と等量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、実施例1に従って抗原結合活性を測定した。なお、抗原のLPSは、A血清型綠膿菌（ATCC 27577）から抽出した。その結果、モノクローナル抗体は、凍結前の抗原結合活性を保持していた。

【0036】実施例10

細胞融合法により作製したヒトIgM産生ヒト・ヒトハイブリドーマMP-5097、MP-5139、MP-5114及びMP-5156（それぞれ微工研条寄2268号、2272号、2269号及び2339号）の培養上清からモノクローナル抗体を精製した。これらモノクローナル抗体は綠膿菌との反応性を有し、それぞれ、B、E、G及びI血清型菌に反応性を持っていた。これら4種のモノクローナル抗体と実施例9で示したモノクローナル抗体の合わせて5種類を、それぞれ終濃度として5mg/mlの濃度となるように、クエン酸ナトリウム（0.02M）、塩化ナトリウム（0.05M）、マンニトール（0.5%）を含む0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解した。このモノクローナル抗体溶液をガラス製バイアルに分注し、-80°Cにて凍結後、真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等量の注射用蒸留水を加えて溶解後、実施例1に従って抗原結合活性を測定した。なお、それぞれの抗原は、A血清型はATCC 27577、B血清型はATCC 27578、E血清型はATCC 27581、G血清型はATCC 27584、及びI血清型はATCC 27586から抽出したLPSを用いた。その結果、モノクローナル抗体は、5種類の血清型綠膿菌LPSそれぞれに対して、凍結前の抗原結合活性を保持していた。

【0037】

【発明の効果】本発明に示したゼラチンあるいはカルボン酸及びその塩の添加により、凍結乾燥時の変性を抑え、抗原結合活性を安定に保持したモノクローナル抗体凍結乾燥製剤の供給が可能となった。モノクローナル抗体のグロブリンタイプは、IgG、IgM、IgA及び

IgEのいずれの型にも適用可能であり、とりわけ安定性の乏しいIgMに対しても十分適用できる。モノクローナル抗体は、ヒト由来である場合もあり、マウスあるいはラット由来の場合でも本発明を適用できる。また、凍結乾燥製剤中に含まれるモノクローナル抗体は一種の*

*場合もあるが、数種のモノクローナル抗体を含む場合にも適用できる。この発明のモノクローナル抗体凍結乾燥製剤は、免疫グロブリン製剤と同様に免疫補充療法剤として、細菌感染症、ウイルス感染症等に対する予防あるいは治療剤として供給可能である。

フロントページの続き

(72)発明者 高木司郎
千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学
株式会社内